

(10) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-59866

(43) 公開日 平成10年(1998) 3月3日

(51) Int Cl. <sup>4</sup>	酸別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/43	ACA		A 6 1 K 37/465	ACA
38/18			C 0 7 K 1/18	
C 0 7 K 1/18			14/745	
14/745			A 6 1 K 37/04	

審査請求 未請求 請求項の数 7 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平8-237146

(22) 出願日 平成8年(1996) 8月19日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成8年2月20日  
株式会社格文社発行の「基礎と臨床第30巻第2号」に発表

(71) 出願人 000173555

財団法人化学及血清療法研究所  
熊本県熊本市大塩一丁目6番1号

(72) 発明者 友清 和彦

熊本県熊本市鯉田町上立田130-8

(72) 発明者 矢野 寿

熊本県熊本市楠7丁目2-1 鯉田メゾン後  
第208号

(72) 発明者 今村 匡伸

熊本県菊池郡合志町豊岡2022-98

(72) 発明者 中野 祥晃

熊本県熊本市武蔵ヶ丘4-18公園住宅4-  
408

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液凝固第V I I 因子及び/もしくは活性化血液凝固第V I I 因子の製造方法

(57) 【要約】

【目的】 F V I I 及び/もしくはF V I I a のF V I I a -A T I I I 複合体との分離方法及び当該方法に基づくF V I I 及び/もしくはF V I I a の製造方法を提供する。

【構成】 F V I I 及び/もしくはF V I I a 含有溶液を陰イオン交換樹脂に展開し吸着させ、C a <sup>2+</sup> 含有溶液で溶出することにより、F V I I 及び/もしくはF V I I a とF V I I a -A T I I I 複合体とを分離する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 血液凝固第VII因子(以下、FVIIと称することがある)及び/もしくは活性化血液凝固第VII因子(以下、FVIIaと称することがある)を含有する溶液を陰イオン交換樹脂に展開することを特徴とする、FVII及び/もしくはFVIIaの活性化血液凝固第VII因子-アンチトロンビンIII複合体(以下、FVIIa-ATIII複合体と称することがある)との分離方法。

【請求項2】 FVIIa-ATIII複合体が夾雑するFVII及び/もしくはFVIIa含有溶液を陰イオン交換樹脂に展開後、FVIIa-ATIII複合体を陰イオン交換樹脂に吸着させ、FVII及び/もしくはFVIIaを溶出または索通りさせ単離精製する請求項1記載の分離方法。

【請求項3】 FVII及び/もしくはFVIIaの溶出及び索通りのための緩衝液に $\text{Ca}^{2+}$ 源を含有し、その濃度が40mM未満である請求項2記載の分離方法。

【請求項4】 FVII及び/もしくはFVIIaの溶出及び索通りのための緩衝液のpHが10.0以下である請求項2または請求項3記載の分離方法。

【請求項5】 請求項1から請求項4のいずれかに記載の分離方法に基づく工程を含むことを特徴とする血液凝固第VII因子及び/もしくは活性化血液凝固第VII因子の製造方法。

【請求項6】 実質的にFVIIa-ATIII複合体を含有しない血液凝固第VII因子及び/もしくは活性化血液凝固第VII因子組成物。

【請求項7】 請求項5記載の製造方法により得られる請求項6記載の血液凝固第VII因子及び/もしくは活性化血液凝固第VII因子組成物。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、血漿蛋白質の分野に関する。より詳細には、血液凝固第VII因子(以下、FVIIと称することがある)及び/もしくは活性化血液凝固第VII因子(以下、FVIIaと称することがある)の製造方法に関し、FVII及び/もしくはFVIIaを含有する血漿画分から陰イオン交換クロマトグラフィーで処することによって夾雑蛋白質含量が低減されたFVIIaを、極めて簡単に生産し得るFVIIaの製造方法を提供するものである。

【0002】

【従来の技術並びに発明が解決しようとする課題】 FVIIはビタミンK依存性の血液凝固因子であり、外因系血液凝固の開始因子であることは広く知られている。他のビタミンK依存性凝固因子と同様にN末端から35残基までのアミノ酸配列に10個の $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸(以下、Glaと称することがある)からなるGla領域を有している(Proc. Natl. Acad. Sc

i. USA, vol. 83, p. 2412-2416, 1986)。FVIIは、*in vitro*において、活性化血液凝固第X因子(以下、FXaと称することがある)、活性化血液凝固第IX因子(以下、FIXaと称することがある)またはトロンビン(以下、FIIaと称することがある)によって、152Arg-153Ileが加水分解され、一個のS-S結合で架橋されたH鎖とL鎖から構成される活性型FVIIすなわちFVIIaに変換されることは知られている(J. Biol. Chem., vol. 251, p. 4797-4802, 1976)。

【0003】 血友病A及び血友病B患者に対する補充療法として、血液凝固第VIII因子(以下、FVIIIと称することがある)及び血液凝固第IX因子(以下、FIXと称することがある)製剤の投与が行なわれている。しかし、当該治療に伴いFVIII及びFIXに対する中和抗体(インヒビターと呼ばれることもある)の出現が問題視されている。このようなインヒビター患者の治療にFVIIaが有効であることは既に報告されており、現在、血漿由来FVIIa及び遺伝子組換え技術を応用した遺伝子組換え型FVIIaの開発が進められている(基礎と臨床, vol. 30, p. 315-325, 1996; Haemostasis, vol. 19, p. 335-343, 1989)。

【0004】 FVIIの血漿からの単離精製方法は、凍結血漿を冷融解し沈澱画分を除いた上清を陰イオン交換樹脂に展開し、Gla領域を有する蛋白質画分(PPSB画分)を分取後、さらにイムノアフィニティークロマトグラフィーを用いる方法が一般的である。しかし、このような極めて特異性の高い免疫吸着法を用いた精製法を行なってもなお、その純化精製は極めて難しい。純化精製が困難な理由は、不純夾雑蛋白質としてFVIIa-ATIII複合体が含有されてくることにあり、イムノアフィニティークロマトグラフィー溶出液のFVIIの純度は85%を超えることはない。また、血液凝固因子の活性化を抑制するためには精製工程にヘパリンを添加することが有効であるが、このヘパリンがFVIIa-ATIII複合体の産生を促進することは既に報告されている(J. Biol. Chem., vol. 268, p. 767-770, 1993)。

【0005】 FVII及び/もしくはFVIIaからのFVIIa-ATIII複合体の分離法として次の二つの方法が考慮され得る。①FVIIa-ATIII複合体を認識しない抗FVIIモノクローナル抗体を用いた免疫アフィニティークロマトグラフィー、②ゲル濾過法に基づく分離。しかしながら、方策①に関しては所望のモノクローナル抗体の取得に多大の労力が必要とされる。また方策②に関してはFVIIa-ATIII複合体の分子量が5.0kDa~80kDaに分布するため、分離を厳密に行なえば著しい工程間収率の低下が予測される。さらに、上記方策以外のFVII及び/もしくはFVIIaから

のFVIIa-ATIII複合体の分離法はこれまでに報告されていない。

【0006】

【課題を解決するための手段】本願発明者等はFVII画分からのFVIIa-ATIII複合体の除去を達成すべく、鋭意研究を重ね種々の検討を行なった結果本願発明を完成するに至った。本願発明は、FVIIa-ATIII複合体が混入すると考えられるFVII及び/もしくはFVIIa含有溶液をCa<sup>2+</sup>濃度4.0mM以下、pH10.0以下に調整し、これを陰イオン交換樹脂に展開し、4.0mM以下のCa<sup>2+</sup>濃度、pH10.0以下の緩衝溶液を用い溶出することによりFVII及び/もしくはFVIIaを純化精製する方法を与える。本願発明によってもたらされる分離方法を使用すれば高度に純化されたFVII及び/もしくはFVIIaが調製可能である。

【0007】以下、本願発明の詳細について説明する。本願発明で用いられる出発物質は、血漿または血漿を適当なクロマトグラフィー操作またはコーンのエタノール分離法もしくはその改良法を用いて調製されたFVII及び/もしくはFVIIa含有溶液である。最適な出発原料としては、血漿を陰イオンクロマトグラフィーで粗精製したG1a領域を有する蛋白溶液(PPSB画分)を抗FVIIモノクローナル抗体固定化アフィニティーゲルに展開し溶出した溶液を原料とする。FVII及び/もしくはFVIIaの精製は特に免疫吸着の原理に基づく方法に限定されるものではなく、FVII及び/もしくはFVIIaを純化可能な方法であればいずれでもよい。

【0008】FVII画分からFVIIa-ATIII複合体を分離する方法においては、陰イオン交換樹脂にFVII及び/もしくはFVIIa含有溶液を展開し、FVIIa-ATIII複合体を吸着除去する。この工程では種々の条件を採用することができ、上記陰イオン交換樹脂との接触はバッチ法または連続カラム法で実施することができ、FVIIa-ATIII複合体が吸着除去されれば、FVII及び/もしくはFVIIaは吸着・非吸着のいずれでもよい。好適には、FVIIa-ATIII複合体並びにFVII及び/もしくはFVIIa共に吸着除去する。使用する陰イオン交換樹脂は特に限定されるものではなく、好適にはDEAEセファロースファーストフロー(ファルマシア社)及びQセファロースファーストフロー(ファルマシア社)等が使用される。FVIIa-ATIII複合体並びにFVII及び/もしくはFVIIaの分離する緩衝液はCa<sup>2+</sup>濃度が4.0mM未満であり且つpHが10.0以下であればいずれでもよい。

【0009】上述の方法でFVIIa-ATIII複合体が除去されたFVII及び/もしくはFVIIa溶液は製剤化に向けてさらなる工程に供される。より完全なFVIIからFVIIaへの活性化が要求される場合は、例

えば、陰イオン交換樹脂上での活性化工程等を経ることが推奨される。

【0010】得られたFVIIaは、治療、診断または他の用途のために製薬学的調合剤に処方することができる。静脈内投与のための調合剤に対しては、組成物を、通常、生理学的に適合し得る物質例えば塩化ナトリウム、グリシン等を含み且つ生理学的条件に適合し得る緩衝されたpHを有する水溶液中に溶解する。また、長期安定性の確保の観点から、最終的剤型として凍結乾燥剤の形態を採ることも考慮され得る。なお、静脈内に投与される組成物のガイドラインは政府の規則、例えば「生物学的製剤基準」によって確立されている。

【0011】かくして、本願発明により、血漿またはFVII及び/もしくはFVIIaを含有する血漿画分から工業的スケールで、FVII及び/もしくはFVIIa組成物を簡便に分離調製する方法、並びに該方法に基づく実質上FVIIa-ATIII複合体等大雑物質を含まないFVIIa製剤を提供することが可能となった。以下に、実施例を挙げて本願発明を具体的に説明するが、本願発明は何等これらに限定されるものではない。

【0012】

【実施例】実施例の記述に先立ち、本願発明において使用されたFVII活性、FVIIa含量及びFVIIa-ATIII複合体含量の測定方法について概説する。

#### 1) FVIIの生物学的活性

FVIIは血液凝固の開始因子である組織因子と結合し血液凝固を開始する。FVIIの定量方法は、検体をFVII欠乏血漿に添加後、一定時間インキュベーションした後、組織因子、リン脂質及びCa<sup>2+</sup>を含有したPT試薬を添加しその凝固時間から算出した。

#### 2) FVIIa含量の測定

FVIIa含量の測定にはSDS-PAGEを使用する。FVII(分子量50kDa)は活性化すると1個のS-S結合で結合された2本鎖に分かれる。H鎖は分子量30kDa、L鎖は分子量20kDa。還元系のSDS-PAGEでは未活性体は分子量50kDaの位置に、H鎖は30kDa、L鎖は20kDaの位置に確認される。検出されるバンドをデンストメーターで読み取り、分子量50kDaのバンドを未活性化FVII含量%、H鎖とL鎖の含量の和をFVIIa含量%とした。活性化率はFVIIa含量をFVII含量とFVIIa含量の和で除した値を百分率(%)で表した。

#### 3) FVIIa-ATIII複合体含量の測定

FVIIa-ATIII複合体含量の測定には非還元系SDS-PAGEを使用した。FVIIa-ATIII複合体は50kDaから80kDaに分布する。非還元系SDS-PAGEで確認される分子量50kDa以上の分子、即ちFVII及びFVIIaより高分子画分をデンストメーターで読み取り、FVIIa-ATIII複合体含量とした。

## 【0013】実施例1

新鮮凍結血漿100リットルを冷融解し沈澱画分を遠心分離した上清を、陰イオン交換体(DEAE-セファデックスA-40、ファルマシア社)に添加し、20mMクエン酸/0.1MNaCl緩衝液(pH7.0)にて十分に洗浄し、20mMクエン酸/0.5MNaCl緩衝液(pH7.0)にてG1aドメインを有するPPSB画分を溶出した。溶出液10リットルを50mMTris/150mMNaCl/5.0mMCaCl<sub>2</sub>緩衝液(pH8.0)で予め平衡化した抗FVIIモノクローナル抗体固定化アフィニティーゲルに展開し、50mMTris/2.5MNaCl/5.0mMCaCl<sub>2</sub>緩衝液(pH8.0)で洗浄後、50mMTris/50mMNaCl/5.0mMCaCl<sub>2</sub>緩衝液(pH8.0)でさらに洗浄し、50mMTris/30mMNaCl/10mMEDTA・2Na緩衝液(pH7.4)で溶出してFVII画分を得た。該FVII画分を予め40mMTris/30mMNaCl緩衝液(pH8.0)で充填されているウイルス\*

\*除去膜(ペンベルグマイクロポラスメンブレン、旭化成)に展開し濾液を得た。得られた濾液のFVII純度は85%であった。

【0014】上記0.2mg/mlのFVII溶液40mlを、予め50mMTris/30mMNaCl緩衝液(pH8.0)で平衡化した内径5.0mm、高さ5.0cmのQ-セファロースファーストフロー(ファルマシア社)カラムに線速300cm/hrで展開し、さらに同線速下、1.0mMTris緩衝液(pH10.0)で10倍カラム容量洗浄し、1.0mMTris(pH10.0)に各種濃度のCaCl<sub>2</sub>を添加した緩衝液で溶出した。溶出画分のSDS-PAGE解析を行ない、FVIIa-AIII複合体含量を定量した。その結果を表1に示す。強イオン交換体である“Q”を使用した場合、FVIIa-AIII複合体の除去はpH10.0の条件下ではCa<sup>2+</sup>濃度40mM以下においてのみ達成された。

【0015】

【表1】

QFF溶出Ca <sup>2+</sup> 濃度(mM)	FVIIa-AIII複合体含量(%)
20	ND
40	ND
50	8.5
60	10

NDは検出限界以下を意味する

## 【0016】実施例2

実施例1と同様な操作でウイルス除去膜濾液として調製した0.2mg/mlのFVII溶液35mlを、予め10mMTris/100mMNaCl緩衝液(pH8.5)で平衡化した内径5.0mm、高さ5.0cmのQ-セファロースファーストフロー(ファルマシア社)カラムに線速300cm/hrで展開し、さらに同線速下、上記緩衝液で10カラム容量洗浄後、1.0mMTris/100mMNaCl/4.0mMCaCl<sub>2</sub>緩衝液(pH8.5)で線速180cm/hrで溶出した。溶出した濃度1.0mg/mlのFVII/FVIIa混合溶液を液相中で25時間熟成させた。熟成後の成績を表2に示す※

※。本成績は強イオン交換体“Q”を使用した場合、溶出緩衝液のCa<sup>2+</sup>濃度が40mM以下及びpHが10.0以下の条件においてFVIIa-AIII複合体の除去が達成され、なお且つ陰イオン交換樹脂での活性化とそれに連続した液相における活性化によりFVIIがほぼ完全に活性化されることを示している。また、本実施例はFVIIa-AIII複合体の分離を強イオン交換体“Q”を使用し実施してもFVIIaの工業的生産が可能であることを示すものである。

【0017】

【表2】

	FVII量 (%)	FVIIa量 (%)	活性化率 (%)	FVIIa-AIII複 合体含量 (%)	FVII力価 比活性(U/μg)
熟成後	2.5	87.0	97.2	ND	40.2

NDは検出限界以下を意味する

## 【0018】実施例3

実施例1と同様な操作でウイルス除去膜濾液として調製

された0.2mg/mlのFVII溶液40mlを予め50mMTris/30mMNaCl緩衝液(pH8.

0)で平衡化した内径5.0mm、高さ5.0cmのDEAE-セファロースファーストフロー(ファルマシア社)カラムに線速300cm/hrで展開し、さらに同線速下、1.0mMTris緩衝液(pH10.0)で10倍カラム容量洗浄し、1.0mMTris(pH10.0)に各種濃度のCaCl<sub>2</sub>を添加した緩衝液で溶出した。溶出成分のSDS-PAGE解析を行ない、FVIIa-AT\*

\*III複合体含量を定量した。その結果を表3に示す。弱イオン交換体である"DEAE"を使用した場合、FVIIa-ATIII複合体の除去はpH10.0の条件下ではCa<sup>2+</sup>濃度15mM以下においてのみ達成された。

[0019]

[表3]

DEAEFF溶出Ca <sup>2+</sup> 濃度(mM)	FVIIa-ATIII複合体含量(X)
10	ND
15	ND
25	1.0
50	4.8

NDは検出限界以下を意味する

#### [0020] 実施例4

実施例1と同様な操作でウイルス除去膜濾液として調製した0.2mg/mlのFVII溶液70mlを、予め50mMTris/30mMNaCl緩衝液(pH8.0)で平衡化した内径5.0mm、高さ3.3cmのDEAE-セファロースファーストフロー(ファルマシア社)カラムに線速200cm/hrで展開し、さらに同線速下、上記緩衝液で10カラム容量洗浄後、50mMTris/30mMNaCl/1.75mMCaCl<sub>2</sub>緩衝液(pH8.0)で線速150cm/hrで溶出した。溶出した濃度2.0mg/mlのFVII及び/もしくはFVIIa混合溶液を液相中で10時間熱成させた。熱成 ※

※後の成績を表4に示す。本成績は弱イオン交換体"DEAE"を使用した場合、溶出緩衝液のCa<sup>2+</sup>濃度が15mM以下、及びpHが10.0以下の条件においてFVIIa-ATIII複合体の除去が達成され、なお且つ陰イオン交換樹脂での活性化とそれに連続した液相における活性化によりFVIIがほぼ完全に活性化されることを示している。また、本実施例はFVIIa-ATIII複合体の分離を弱イオン交換体"DEAE"を使用し実施してもFVIIaの工業的生産が可能であることを示すものである。

[0021]

[表4]

FVII量 (%)	FVIIa量 (%)	活性化率 (%)	FVIIa-ATIII量 複合体含量 (%)	FVII力価 比活性(U/μg)	
熱成後	1.5	95.1	98.4	ND	39.2

NDは検出限界以下を意味する

フロントページの続き

(72)発明者 丸野 真一  
熊本県菊池郡西合志町須屋1733-31

(72)発明者 緒方 洋一  
熊本県熊本市帯山7丁目9-142  
(72)発明者 寺野 剛  
熊本県菊池郡西合志町須屋1548-2

